乳酸链球菌素对腹泻小鼠盲肠菌群结构及脂代谢的影响

贺美玲[1] 王纯洁[2] 贾知锋[2] 斯木吉德[1] 吉米斯[1] 刘 波[1] 陈 浩[1] 超 克[1] 敖日格乐[1*]

（1.内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018；2.内蒙古农业大学兽医学院，呼和浩特 010018）

摘 要：本试验旨在研究乳酸链球菌素（Nisin）对腹泻小鼠盲肠菌群结构和脂代谢的影响。选择 7～9 周龄无特定病原体（SPF）级 50 只小鼠（雌雄各占 1/2），随机分成 5 组，分别为空白对照组、阴性对照组、环丙沙星组、氨苄青霉素组及 Nisin 组。除空白对照组小鼠腹腔注射等量灭菌生理盐水外，其余各组小鼠连续 3 d 腹腔注射致病性大肠杆菌（*E.coli*）O_1 悬液（2.50×10^{11} CFU/mL）0.2 mL/只构建小鼠腹泻模型。连续注射 3 d 后，空白对照组和阴性对照组灌胃灭菌生理盐水，其他组灌胃对应物质，每天 2 次，每次 0.3 mL，连续灌胃 15 d。第 15 天灌胃 2 h 后采样，采用高通量测序技术对小鼠盲肠内容物中细菌结构测序分析，通过酶联免疫吸附测定（ELISA）法对小鼠血清、空肠、回肠和脑组织中金属肽酶含血小板反应蛋白 1(ADAMTS1)、总胆固醇（TC）和胰岛素(INS)的含量进行检测。结果显示：与阴性对照组相比，Nisin 使小鼠血清、回肠和脑组织中 ADAMTS1 的含量和回肠中 INS 的含量显著降低（$P<0.05$），血清、空肠和脑组织中 TC 的含量显著增加（$P<0.05$），并使小鼠各阶段的体重显著增加（$P<0.05$）。Nisin 组小鼠盲肠菌群丰富度最高(ACE 指数=2 469.54、Chao1 指数=3 340.29)且多样性最高(Shannon 指数=7.56)，而阴性对照组则最低。Nisin 组中疣微菌门(Verrucomicrobia)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)及厚壁菌门(Firmicutes)为优势菌门。阴性对照组中放线菌门(Actinobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、变形菌门(Proteobacteria)及拟杆菌门为优势菌门。由此得出，Nisin 可提高盲肠菌群多样性，降低血清、回肠和脑组织中 ADAMTS1 的含量和回肠中 INS 的含量，增加血清、空肠和脑组织中 TC 的含量，从而影响腹泻小鼠盲肠菌群结构及脂代谢。

关键词：乳酸链球菌素；肠道菌群；脑-肠；金属肽酶含血小板反应蛋白 1；高通量测序

中图分类号：R574.62 文献标识码：A 文章编号：

收稿日期：2017-12-04
基金项目：国家自然科学基金项目（31660677）
作者简介：贺美玲（1993—），女，内蒙古多伦人，硕士研究生，从事益生菌与脂肪代谢的研究。E-mail: hml0421@163.com
*通信作者：敖日格乐，教授，博士生导师，E-mail: aori6009@163.com

通过摄入益生菌可平衡动物肠道内菌群结构，通过研究益生菌的代谢产物[如乳酸链球菌素(Nisin)]对肠道微生物多样性和脂代谢的影响[1]，可以帮助人们深入了解益生菌的代谢产物对肠道菌群和肥胖症的影响。肥胖症是由能量摄入和代谢不平衡所引起的一种慢性疾病，其一直影响着动物的胴体品质[2]。近年来，研究发现，肠道菌群与肥胖存在密切的相关性，而脂代谢的紊乱严重影响了肠道菌群的结构[3]。据研究发现，肠道微生物群落对于处理膳食多糖是必不可少的，并发现与无菌饲养相比，正常饲养使小鼠体内脂肪量增加 60%，胰岛素含量减少[4]。金属肽酶含血小板反应蛋白 1(ADAMTS1)是调控脂肪干细胞分化成脂肪细胞的关键因子。高脂饮食以及糖皮质激素类药物会下调 ADAMTS1 的分泌，最终导致脂肪的增加[5]。乳酸乳球菌可用于治疗炎症性肠病、溃疡性结肠炎、腹泻、乳糜泻、变态反应和口腔黏膜炎等[6-7]。致病性大肠杆菌（*E. coli*）可引起多种疾病的发生，如腹泻及败血症等[8]。致病性 *E. coli* O_1 是犊牛腹泻病最常见的病原菌之一[9]。目前，抗生素广泛应用于治疗人类及家畜腹泻病，而抗生素的滥用使细菌耐药性增加[10-11]。据研究，Nisin 在治疗小鼠腹泻方面有望替代抗生素，Nisin 对家畜脂代谢十分重要[12]。本试验通过致病性 *E.coli* O_1 构建小鼠腹泻模型，然后对腹泻小鼠灌胃 Nisin，研究 Nisin 对腹泻小鼠盲肠菌群结构以及血清、空肠、回肠与脑组织中 ADAMTS1、总胆固醇（TC）和胰岛素（INS）含量的影响，以期为研究 Nisin 这类益生菌代谢产物对肠道菌群和脂代谢的影响奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

受试菌：牛源致病性 *E.coli* O_1 和 Nisin 均由内蒙古农业大学动物生产学实验室从奶牛直肠粪样中分离提取纯化[13]。

抗生素：氨苄青霉素（ampicillin）购自葵花药业集团湖北武当有限公司；盐酸环丙沙星（ciprofloxacin）购自吉林省百年六福堂药业有限公司。

1.2　试验动物

7～9 周龄无特定病原体（SPF）级小鼠，雌雄各占 1/2，体重(20±2) g，购自内蒙古医科大学实验动物中心。小鼠饲养在恒定温度[（22±2）℃]和湿度[（55±5）%]的环境中，饲喂 SPF 级饲料[14]。

1.3 试验方法

1.3.1 试验分组及给药方案

选择 7～9 周龄 SPF 级 50 只小鼠（雌雄各占 1/2），随机分成 5 组，分别为空白对照组、阴性对照组、环丙沙星组、氨苄青霉素组及 Nisin 组。除空白对照组腹腔注射灭菌生理盐水（0.2 mL/只）外，其余各组小鼠均连续 3 d 腹腔注射致病性 *E.coli* O_1 悬液（2.50×10^{11} CFU/mL）0.2 mL/只构建小鼠腹泻模型[15]。连续注射 3 d 后，各组小鼠灌服对应试验药品（给药方案见表 1），连续灌服 15 d，2 次/d（08:00、16:00），每次 0.3 mL，在第 15 天灌胃 2 h 后对小鼠进行样品采集。

表 1　试验分组情况及给药方案

Table 1　xperimental grouping and dosing regimen

组别 Groups	小鼠 Mice/只	给药方案 Drug administration
空白对照组 Blank control group	10	连续灌服灭菌生理盐水 15 d，2 次/d，每次每只 0.3 mL
阴性对照组 Negative control group	10	连续灌服灭菌生理盐水 15 d，2 次/d，每次每只 0.3 mL
环丙沙星组 Ciprofloxacin group	10	连续灌服环丙沙星（0.13 g/mL）[15]15 d，2 次/d，每次每只 0.3 mL
氨苄青霉素组 Ampicillin group	10	连续灌服氨苄青霉素（0.001 g/mL）[16]15 d，2 次/d，每次每只 0.3 mL
Nisin 组 Nisin group	10	连续灌服 Nisin（0.002 g/mL）[14]15 d，2 次/d，每次每只 0.3 mL

每只动物单次所用药量需用 0.3 mL 蒸馏水配合灌服。

The dose of each animal used a single dose of 0.3 mL of distilled water in conjunction with

gavage.

1.3.2 样品采集

在试验期间每天称小鼠体重，在第 15 天灌胃 2 h 后，每组取 7 只小鼠，脱臼处死，通过眼眶采血，分离血清并保存；在无菌操作台中对每只小鼠进行消毒处理后，打开小鼠腹腔分别称取 0.5 g 盲肠内容物以及空肠、回肠和脑组织并迅速置于无菌无酶的 2.5 mL 离心管中，然后放入-80 ℃超低温冰箱保存备用。

1.3.3 指标测定

将空肠、回肠与脑组织进行研磨后，分别称取 0.1 g 各加 900 μL 的磷酸盐缓冲液（PBS），制备成组织匀浆液，混匀并离心保留上清液，放入-80 ℃超低温冰箱保存备用。对血清、空肠、回肠及脑组织采用酶联免疫吸附测定（ELISA）法检测 ADAMTS1、TC 和 INS 的含量，按照说明书操作，试剂盒均购自北京诚林生物科技有限公司。

将装有盲肠内容物的离心管放入干冰中送往北京诺禾致源生物信息科技有限公司，对细菌 341F(5’-CCTACGGGNGGCWGCAG-3’)、805R(5’-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3’)16r RNA V3～V4 区进行扩增测序。详细步骤见参考文献[17]。利用 barcode 区分样品序列，将各组样本序列过滤后，进行 Alpha 多样性及菌群结构分析，Alpha 多样性指数包括丰富度指数(Chao1 指数、ACE 指数)、多样性指数(Simpson 指数、Shannon 指数)、覆盖率(Coverage 指数)。利用 Mothur 软件对每组样品的操作分类单元(OTU)进行聚类分析，其代表了组间样品的丰度[18]。

1.4 数据统计

用 Excel 2016 处理数据，采用 SAS 9.0 统计软件对数据进行单因素方差分析，$P<0.05$ 为有显著性差异，认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Nisin 对小鼠体重的影响

由表 2 可知，1～5 d 阶段，Nisin 组小鼠的体重显著高于空白对照组和阴性对照组($P<0.05$)。在 6～10 d 阶段，Nisin 组小鼠的体重显著高于其他各组($P<0.05$)，其他各组之间无显著差异

(P>0.05)。在 11～15 d 阶段，Nisin 组小鼠的体重显著高于阴性对照组、环丙沙星组及氨苄青霉素组(P<0.05)，与空白对照组差异不显著(P>0.05)。上述结果说明 Nisin 能有效缓解感染 *E.coli* O_1 对小鼠体重的影响。

表 2　Nisin 对小鼠不同阶段体重的影响

Table 2　Effects of Nisin on body weight at different stages of mice　g/只

时　　间 Time/d	空白对照组 Blank control group	阴性对照组 Negative control group	环丙沙星组 Ciprofloxacin group	氨苄青霉素组 Ampicillin group	乳酸链球菌素组 Nisin group
1～5	26.94 ± 1.19^{c}	27.54 ± 1.36^{bc}	28.14 ± 1.22^{ab}	28.38 ± 0.94^{ab}	29.38 ± 0.98^{a}
6～10	31.02 ± 2.51^{b}	30.99 ± 1.18^{b}	31.11 ± 1.69^{b}	31.05 ± 0.80^{b}	33.22 ± 1.74^{a}
11～15	35.05 ± 0.50^{a}	32.72 ± 0.65^{b}	33.63 ± 0.82^{b}	33.90 ± 0.86^{b}	36.41 ± 0.52^{a}

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P＜0.05）。下表同。

Values in the same row with different lower case letter superscripts are significantly different (P<0.05) The same as below.

2.2　Nisin 对小鼠血清、空肠、回肠与脑组织中 ADAMTS1 含量的影响

由表 3 可知，在血清中，Nisin 组小鼠 ADAMTS1 的含量显著低于空白对照组和阴性对照组(P＜0.05)；在空肠中，Nisin 组小鼠 ADAMTS1 的含量显著低于阴性对照组(P＜0.05)，显著高于环丙沙星组和氨苄青霉素组(P＜0.05)；在回肠中，Nisin 组小鼠 ADAMTS1 的含量显著低于其他各组(P＜0.05)；在脑组织中，Nisin 组小鼠 ADAMTS1 的含量显著低于空白对照组和阴性对照组(P＜0.05)，显著高于环丙沙星组(P＜0.05)。

表 3　Nisin 对小鼠血清、空肠、回肠与脑组织中 ADAMTS1 含量的影响

Table 3　Effects of Nisin on ADAMTS1 concentration in serum, jejunum, ileum and brain tissue of mice

项目 Items	空白对照组 Blank control group	阴性对照组 Negative control group	环丙沙星组 Ciprofloxacin group	氨苄青霉素组 Ampicillin group	乳酸链球菌素组 Nisin group
血清 Serum/（ng/mL）	19.11±1.67[a]	20.48±1.56[a]	17.31±3.75[b]	16.20±1.79[b]	16.94±1.86[b]
空肠 Jejunum/（ng/g）	18.75±1.87[bc]	22.04±2.25[a]	17.13±2.30[c]	13.17±6.71[d]	19.04±1.33[b]
回肠 Ileum/（ng/g）	18.96±2.55[a]	19.09±8.05[a]	15.22±7.20[b]	15.16±4.78[b]	13.07±5.43[c]
脑组织 Brain tissue/（ng/g）	20.88±3.14[a]	20.28±1.19[a]	15.62±5.74[c]	18.77±1.81[b]	18.26±4.93[b]

2.3 Nisin 对小鼠血清、空肠、回肠与脑组织中 TC 含量的影响

由表 4 可知，在血清中，Nisin 组 TC 的含量高于阴性对照组、环丙沙星组和氨苄青霉素组，低于空白对照组，但差异均未达显著水平(P>0.05)；在空肠中，Nisin 组 TC 的含量与空白对照组差异不显著(P>0.05)，但显著高于其他各组(P＜0.05)；在回肠中，Nisin 组 TC 的含量显著高于环丙沙星组(P＜0.05)；在脑组织中，Nisin 组 TC 的含量显著低于氨苄青霉素组(P＜0.05)，显著高于其他各组(P＜0.05)。

表 4 Nisin 对小鼠血清、空肠、回肠与脑组织中 TC 含量的影响

Table 4 Effects of Nisin on TC content in serum, jejunum, ileum and brain tissue of mice

项目 Items	空白对照组 Blank control group	阴性对照组 Negative control group	环丙沙星组 Ciprofloxacin group	氨苄青霉素组 Ampicillin group	乳酸链球菌素组 Nisin group
血清 Serum/(nmol/mL)	0.67±0.06[a]	0.54±0.03[b]	0.59±0.08[b]	0.55±0.05[b]	0.61±0.06[ab]

空肠 Jejunum/(nmol/g)	0.65±0.05^{a}	0.59±0.06^{b}	0.53±0.03^{bc}	0.47±0.15^{c}	0.66±0.07^{a}
回肠 Ileum/(nmol/g)	0.51±0.11^{a}	0.55±0.08^{a}	0.44±0.13^{b}	0.51±0.18^{a}	0.56±0.21^{a}
脑组织 Brain tissue/(nmol/g)	0.52±0.12^{c}	0.56±0.07^{c}	0.53±0.16^{c}	0.74±0.43^{a}	0.64±0.08^{b}

2.4 Nisin 对小鼠血清、空肠、回肠与脑组织中 INS 含量的影响

由表 5 可知，在血清中，Nisin 组和空白对照组 INS 的含量显著高于其他各组(P＜0.05)，且以 Nisin 组的含量最高；在空肠中，氨苄青霉素组 INS 的含量显著低于其他各组(P＜0.05)，阴性对照组 INS 的含量显著高于其他各组(P＜0.05)；在回肠中，空白对照组 INS 的含量显著高于其他各组(P＜0.05)，Nisin 组 INS 的含量显著低于其他各组(P＜0.05)；在脑组织中，空白对照组中 INS 的含量显著高于其他各组(P＜0.05)，环丙沙星组的 INS 含量显著低于其他各组(P＜0.05)。

表 5 Nisin 对小鼠血清、空肠、回肠与脑组织中 INS 含量的影响

Table 5 Effects of Nisin on TC content in serum, jejunum, ileum and brain tissue of mice

项目 Items	空白对照组 Blank control group	阴性对照组 Negative control group	环丙沙星组 Ciprofloxacin group	氨苄青霉素组 Ampicillin group	乳酸链球菌素组 Nisin group
血清 Serum/（mIU/L）	5.94±0.29^{a}	5.20±0.11^{b}	5.34±0.56^{b}	5.38±0.41^{b}	6.05±0.58^{a}
空肠 Jejunum/（mIU/mg）	6.10±0.13^{b}	6.62±0.61^{a}	6.13±0.37^{b}	5.03±1.00^{c}	6.23±0.28^{b}
回肠 Ileum/（mIU/mg）	6.28±1.12^{a}	5.51±1.74^{b}	5.05±2.09^{c}	5.49±2.25^{b}	3.91±2.30^{d}
脑组织 Brain	7.17±0.29^{a}	6.49±1.55^{b}	5.29±1.91^{c}	6.44±0.81^{b}	6.51±0.20^{b}

tissue/（mIU/mg）

2.5 Nisin 对小鼠盲肠菌群多样性的影响

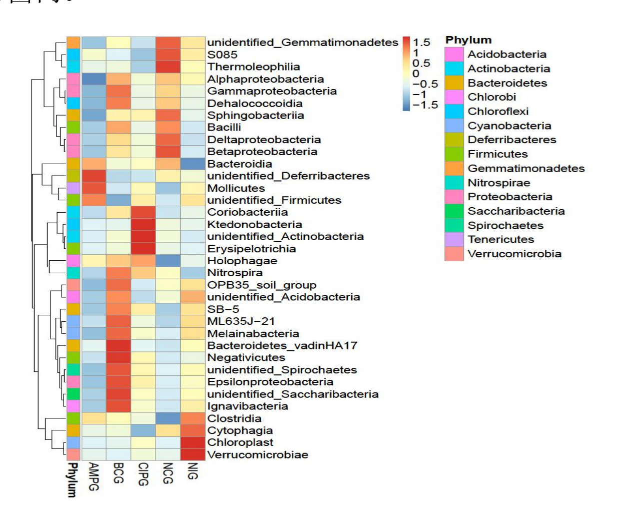
表 6 各组小鼠盲肠内容物中菌群 OTU 数量及 Alpha 多样性指数

Table 6 OTU number and Alpha diversity indices of microflora in caecum content of mice in groups

项目 Items	空白对照组 Blank control group	阴性对照组 Negative control group	环丙沙星组 Ciprofloxacin group	氨苄青霉素组 Ampicillin group	乳酸链球菌素组 Nisin group
OTU 数量 OUT number	1 652.75^{a}	1 227.75^{c}	1 275.50^{c}	930.00^{d}	1 507.75^{b}
ACE 指数 ACE index	1 950.47^{a}	969.54^{e}	1 571.13^{c}	1 117.71^{d}	1 417.25^{b}
Chao1 指数 Chao1 index	1 905.61^{a}	340.29^{e}	1 536.16^{b}	1 087.81^{d}	1 378.45^{c}
Shannon 指数 Shannon index	7.13^{a}	6.63^{b}	6.91^{b}	6.47^{b}	7.56^{a}
Simpson 指数 Simpson index	0.008 1^{b}	0.017 4^{a}	0.001 9^{e}	0.005 7^{c}	0.003 3^{d}
Coverage 指数 Coverage index	0.970 7	0.971 1	0.977 3	0.974 4	0.975 0

由表 6 可知，在各组盲肠内容物样品中，菌群 OTU 数量最多的是空白对照组(1 652.75)，其次是 Nisin 组（1 507.75），最小是氨苄青霉素组（930.0），说明 Nisin 组和空白对照组盲肠中菌群丰度很高，并且各组间存在差异。在盲肠内容物样品中，Nisin 组的菌群 Alpha 多样性指数中的 ACE 指数（1 417.25）、Chao1 指数（1 378.45）和 Shannon 指数（7.56)均显著高于阴性对照组(ACE 指数为 969.54，Chao1 指数为 340.29，Shannon 指数为 6.63)，Simpson 指数（0.003 3）显著低于阴性对照组（0.017 4）。这表明 Nisin 组小鼠中盲肠菌群多样性高于阴性对照组。Nisin 组 Shannon 指数在 5 个组中最大，Simpson 指数在 5 个组中处在较低水平，说明 Nisin 组小鼠盲肠菌群多样性在 5 个组中处在较高水平。各组盲肠内容物菌群的 Coverage 指数均在 9.7 以上，因此，样品测序质量较高，未被检测到的可能性极低。

利用Mothur软件对各组样品进行注释。通过对各组间小鼠盲肠内容物的16S rRNA V3～V4 区测序，根据物种注释结果，各组在门水平上的物种相对丰度见图 1。Nisin 组中疣微菌门(Verrucomicrobia)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)及厚壁菌门(Firmicutes)为优势菌门。阴性对照组中放线菌门(Actinobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、变形菌门(Proteobacteria)及拟杆菌门为优势菌门。环丙沙星组中厚壁菌门、放线菌门、纤线杆菌纲（Ktedonobacteria）(未定门)及 Coriobacteriia(未定门)为优势菌门。氨苄青霉素组中脱铁杆菌门(Deferribacteres)及厚壁菌门为优势菌门。空白对照组中拟杆菌门、厚壁菌门及 Saccharibacteria 为优势菌门。



AMPG：氨苄青霉素组 ampicillin group；BCG：空白对照组 blank control group；CIPG：盐酸环丙沙星组 ciprofloxacin group；NCG：阴性对照组 negative control group；NIG：乳酸链球菌素组 Nisin group。

图 1　各组物种相对丰度聚类图

Fig.1　Cluster of relative abundances of species in groups

2.6　Nisin 对小鼠盲肠菌群构成的影响

5 组盲肠内容物样品中在门水平上排名靠前的 4 种菌群所占比例见表 7。Nisin 组中厚壁菌门所占比例显著高于其他各组（P<0.05），拟杆菌门所占比例显著低于其他各组（P<0.05）。这说明 Nisin 有利于增加小鼠盲肠中厚壁杆菌门的数量，降低拟杆菌门的数量。

表 7　在门水平上各组小鼠盲肠内容物中菌群构成

Table 7 Microflora composition in caecum content of mice in groups at phylum level %

项目 Items	空白对照组 Blank control group	阴性对照组 Negative control group	环丙沙星组 Ciprofloxacin group	氨苄青霉素组 Ampicillin group	乳酸链球菌素组 Nisin group
拟杆菌门 Bacteroidetes	41.66^{b}	50.43^{a}	42.85^{b}	50.67^{a}	31.12^{c}
厚壁杆菌门 Firmicutes	43.48^{b}	33.63^{d}	44.06^{b}	40.99^{c}	46.15^{a}
疣微菌门 Verrucomicrobia	1.15^{d}	3.88^{bc}	7.15^{a}	2.54^{c}	4.81^{b}
蓝细菌门 Cyanobacteria	0.48^{c}	0.17^{d}	0.73^{b}	0.14^{d}	2.56^{a}

3 讨 论

动物肠道内生存着大量的细菌，一旦肠道生物屏障中的微生态系统失衡，就会导致大量致病菌（如大肠杆菌等）入侵和定植[19]。此外，肠道也是动物吸收营养物质的重要场所，摄入过多的食物后体内脂肪开始堆积[20]。肠道菌群在调节能量代谢过程中起到非常重要的作用，调整菌群的失衡可使体重、血清 TP 含量和空腹血糖水平显著下降[21]。给无菌小鼠定植肠道菌群后，其消耗高脂高糖食物的量显著增加，由此说明肠道菌群可显著增强小鼠的消化能力，从而使小鼠获取食物能量的能力加强[22]。肠道内致病菌和益生菌（如双歧杆菌、乳酸杆菌等）数量的变化是肠道健康的重要指标[23]。Yassour 等[24]认为，抗生素对肠道菌群的影响机制还未清晰，但抗生素可显著影响人类及动物肠道菌群的多样性。同时，人类及动物肠道中存在着的大量细菌可帮助分解难以消化的食物。把正常小鼠的肠道菌群移植给无菌小鼠，在摄食量未增加的情况下，无菌小鼠的体脂含量显著增加，同时一些与脂代谢相关的因子的含量也发生了改变，这些改变也许是因为肠道菌群影响宿主对食物中能量的吸收所致[25]。ADAMTS1 控制脂肪分化和监管脂肪平衡的关键分子[5]。研究发现，成熟的脂肪细胞会正常分泌 ADAMTS1[26-27]。目前，对小鼠肥胖症的研究主要是通过检测小鼠血液中相关因子的信号通路和相关蛋白的表达量以及通过高通量检测肠道菌群的结构谱来进行的[28]。具有

高的 ADAMTS1 含量的小鼠，它们体内的脂肪存储量比野生小鼠的脂肪存储要小[29-30]。ADAMTS1 能够阻止糖皮质诱导的脂肪分化[31]。研究表明，通过降低脂肪组织中 ADAMTS1 的含量可导致小鼠脂肪组织重量增加、INS 敏感性下降及脂代谢紊乱，这一发现与 *ADAMTS*1 在肥胖小鼠中的表达下调及 *ADAMTS*1 的表达量与人体的身体质量指数(BMI)呈负相关的结果相一致[32]。肥胖常导致脂代谢紊乱，其机制是由于内脏脂肪堆积，促进糖异生，高含量的 INS 使食欲增加，加重胆固醇代谢紊乱，促进肥胖加重[33]。研究发现，食用含乳酸球菌食物后，人体血液中高密度脂蛋白的含量显著升高[34]，但是食用含乳酸杆菌食物后，人体血液中高密度脂蛋白的含量显著降低[35]。在饲粮中添加微生物菌种可提高猪的生产性能和自身免疫力，在改善营养物质代谢等方面效果显著[36]。乳酸发酵的乳酸乳球菌最近被评估为潜在的益生菌[37]。本试验中，益生菌的代谢产物 Nisin 能缓解小鼠体重的增加，降低小鼠血清中 TC 的含量，从而达到改善小鼠肠道菌群结果及脂代谢紊乱的效果，这说明 Nisin 有降低患心脑血管病的危险的作用[38-39]；同时，Nisin 能降低回肠中 INS 的含量，对调节脂代谢合成具有重要意义，这一结果与 Xu 等[40]所得结果一致。研究发现，肥胖与拟杆菌门及厚壁菌门相对丰度的改变存在关系，饮食治疗前，肥胖者与苗条者比较，其肠道中拟杆菌门的数量非常少，但厚壁菌门数量较多，饮食治疗后，肥胖者出现了肠道中拟杆菌门数量增加、厚壁菌门数量减少的现象[25]。

本研究中，与阴性对照组相比，Nisin 可使小鼠血清、空肠、回肠和脑组织中 ADAMTS1 含量显著降低，血清、空肠和脑组织中 TC 的含量增加，回肠中 INS 的含量降低，导致小鼠体重增加；Nisin 使小鼠盲肠内容物中厚壁菌门的数量增加，拟杆菌门的数量降低，说明 Nisin 可调节小鼠盲肠菌群构成；Nisin 使小鼠盲肠内容物菌群的 ACE、Chao1、Shannon 指数显著增加，Simpson 指数显著降低，说明 Nisin 可提高小鼠盲肠菌群多样性。此外，阴性对照组小鼠盲肠内容物菌群的 ACE、Chao1、Shannon 指数最低较空白对照组显著降低，Simpson 指数较空白对照组显著升高，说明 *E. coli* O_1 可破坏小鼠肠道微生物的动态平衡，使小鼠盲肠菌群多样性显著降低，这一结果与李艺等[41]所得结果相似。

综上所述，一方面，Nisin 通过降低血清、空肠、回肠和脑组织中 ADAMTS1 的含量和

回肠中 INS 的含量，增加血清、空肠和脑组织中 TC 的含量，使小鼠体重增加；另一方面，Nisin 通过增加小鼠肠道内容物中菌群的多样性，增加厚壁菌门和蓝细菌门的数量，降低拟杆菌门的数量，调整盲肠菌群结构。可见，Nisin 很可能是通过改变小鼠肠道固有菌群结构使小鼠体重及激素分泌发生变化。

4 结 论

Nisin 可提高盲肠菌群多样性，降低血清、回肠和脑组织中 ADAMTS1 的含量和回肠中 INS 的含量，增加血清、空肠和脑组织中 TC 的含量，从而影响腹泻小鼠盲肠菌群结构及脂代谢。

参考文献：

[1] 王丽凤.益生菌 *L. plantarum* P-8 对肉鸡肠道菌群、肠道免疫和生长性能影响的研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2014:2–10.

[2] 袁登越,刘炬,邓文清,等.脂肪和肥胖相关基因与肥胖关系的研究进展[J].动物营养学报,2017,29(3):755–761.

[3] CANI P D,DELZENNE N M.The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease[J].Current Pharmaceutical Design,2009,15(13):1546–1558.

[4] BÄCKHED F,DING H,WANG T,et al.The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J].Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America,2004,101(44):15718–15723.

[5] WONG J C,KRUEGER K C,COSTA M J,et al.A glucocorticoid- and diet-responsive pathway toggles adipocyte precursor cell activity *in vivo*[J].Science Signaling,2016,9(451):103.

[6] LEBLANC J G,AUBRY C,CORTES-PEREZ N G,et al.Mucosal targeting of therapeutic molecules using genetically modified lactic acid bacteria:an update[J].FEMS Microbiology Letters,2013,344(1):1–9.

[7] LEBLANC J G,DEL CARMEN S,TURK M Z,et al.Mechanisms involved in the anti-inflammatory properties of native and genetically engineered lactic acid bacteria[J].Anti-Infective Agents,2016,11(1):60–70.

[8] 杜向党.牛源大肠杆菌 I 型整合子的调查及对氟苯尼考耐药性的研究[D].博士学位论文.北京:中国农业大学,2005.

[9] 杨斯琴.抑菌蒙药复方筛选及其对肠黏膜屏障的作用机制研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2016.

[10] ZHU Y G,ZHAO Y,LI B,et al.Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes[J].Nature Microbiology,2017,2:16270.

[11] ESLAMI M,BOLOURCHI M,SEIFI H A,et al.Treatment of clinical endometritis in dairy cows by previously used controlled internal drug release devices[J].Theriogenology,2015,84(3):437–445.

[12] 贾知锋,王纯洁,敖日格乐,等.乳酸链球菌素对大肠杆菌所致腹泻小鼠的脑-肠轴中单胺类神经递质的影响[J].畜牧兽医学报,2016,47(9):1931–1939.

[13] 杨斯琴,敖日格乐,王纯洁,等.内蒙古呼和浩特地区牛源致病性大肠杆菌的血清型、毒力基因检测及耐药性分析[J].中国预防兽医学报,2015,37(10):761-764.

[14] JIA Z F,CHEN ARGL,BAO F X, et al.Effect of nisin on microbiome-brain-gut axis neurochemicals by *Escherichia coli*-induced diarrhea in mice[J].Microbial Pathogenesis,2018,119:65-71.

[15] SINGH A P,PRABHA V,RISHI P.Value addition in the efficacy of conventional antibiotics by nisin against *Salmonella*[J].PLoS One,2013,8(10):e76844.

[16] CHENG M,QIAN L T,SHEN G D,et al.Microbiota modulate tumoral immune surveillance in lung through a γδT17 Immune Cell-dependent mechanism[J].Cancer

Research,2014,74(15):4030–4041.

[17] ZENG B,HAN S S,WANG P,et al.The bacterial communities associated with fecal types and body weight of rex rabbits[J].Scientific Reports,2015,5:9342.

[18] LUNDBERG D S,YOURSTONE S,MIECZKOWSKI P,et al.Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing[J].Nature Methods,2013,10(10):999–1002.

[19] QIN J J,LI R Q,RAES J,et al.A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic Sequencing[J].Nature,2010,464(7285):59–65.

[20] ROSEN E D,MACDOUGALD O A.Adipocyte differentiation from the inside out[J].Nature Reviews Molecular Cell Biology,2006,7(12):885–896.

[21] FEI N,ZHAO L P.An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice[J].The ISME Journal,2013,7(4):880–884.

[22] WONG J C,KRUEGER K C,COSTA M J,et al.A glucocorticoid- and diet-responsive pathway toggles adipocyte precursor cell activity in vivo[J].Science Signaling,2016,9(451):103.

[23] 陈玉洁.酸马奶源酵母菌代谢物对致病性大肠杆菌的抑菌作用机理研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2015:87.

[24] YASSOUR M,VATANEN T,SILJANDER H,et al.Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability[J].Science Translational Medicine,2016,8(343):343ra81.

[25] LEY R E,TURNBAUGH P J,KLEIN S,et al.Microbial ecology:human gut microbes associated with obesity[J].Nature,2006,444(7122):1022–1023.

[26] BERRY D C,STENESEN D,ZEVE D,et al.The developmental origins of adipose

tissue[J].Development,2013,140(19):3939–3949.

[27] ROSEN E D,SPIEGELMAN B M.What we talk about when we talk about fat[J].Cell,2014,156(1/2):20–44.

[28] CHANG C J,LIN C S,LU C C,et al. Corrigendum:*Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota[J].Nature Communications,2017,8:16130.

[29] RODEHEFFER M S,BIRSOY K,FRIEDMAN J M.Identification of white adipocyte progenitor cells *in vivo*[J].Cell,2008,135(2):240–249.

[30] TANG W,ZEVE D,SUH J M,et al.White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature[J].Science,2008,322(5901):583–586.

[31] MACDOUGALD O A,MANDRUP S.Adipogenesis:forces that tip the scales[J].Trends in Endocrinology & Metabolism,2002,13(1):5–11.

[32] CHEN S Z,NING L F,XU X,et al.The miR-181d-regulated metalloproteinase Adamts1 enzymatically impairs adipogenesis via ECM remodeling[J].Cell Death and Differentiation,2016,23(11):1778–1791.

[33] MOHANTY B,ARUL S,KUMAR R R,et al.Metabolic syndrome-prevalence and significance of its detection in selected population in Pondicherry[J].Indian Journal of Physiology and Pharmacology,2008,52(3):307–310.

[34] HASHIMOTO H,YAMAZAKI K,HE F,et al.Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus casei subsp.* cssei TMC 0409 strain observed in rats fed cholesterol[J].Nihon Chikusan Gakkaiho,1999,70(2):90–97.

[35] ROSSOUW J E,BURGER E M,VAN DER VYVER P,et al.The effect of skim milk,yoghurt,and full cream milk on human serum lipids[J].The American Journal of Clinical Nutrition,1981,34(3):351–356.

[36] ROSS G R,GUSILS C,OLISZEWSKI R,et al.Effects of probiotic administration in swine[J].Journal of Bioscience and Bioengineering,2010,109(6):545–549.

[37] VILLATORO-HERNANDEZ J,MONTES-DE-OCA-LUNA R,KUIPERS O P.Targeting diseases with genetically engineered *Lactococcus lactis* and its course towards medical translation[J].Expert Opinion on Biological Therapy,2011,11(3):261–267.

[38] 孙兆男,张卫东,杨云竣,等.益生菌干预对高脂高糖饮食诱导肥胖小鼠肠道菌群及脂代谢影响的研究[J].中国微生态学杂志,2017,29(2):142–145.

[39] TANIDA M,SHEN J,MAEDA K,et al.High-fat diet-induced obesity is attenuated by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* ST11(NCC2461) in rats[J].Obesity Research & Clinical Practice,2008,2(3):159–169.

[40] XU S,DOU Y,YE B,et al.Ganoderma lucidum polysaccharides improve insulin sensitivity by regulating inflammatory cytokines and gut microbiota composition in mice[J].Journal of Functional Foods,2017,38:545–552.

[41 李艺,孟镇,钟其顶,等.用 DGGE 技术分析植物乳杆菌对小鼠肠道菌群失调的影响[J].食品工业科技,2013,34(12):327–330,334.

Effects of Nisin on Caecal Microflora Structure and Lipid Metabolism of Mice with Diarrhea

HE Meiling[1] WANG Chunjie[2] JIA Zhifeng[2] Simujide[1] Jimisi[1] LIU Bo[1] CHEN Hao[1]

*Corresponding author, professor, E-mail: aori6009@163.com (责任编辑 菅景颖)

CHAO Ke[1] Aorigele[1*]

(1. *College of Animal Science*, *Inner Mongolia Agricultural University*, *Hohhot* 010018, *China*; 2. *College of Veterinary*, *Inner Mongolia Agricultural University*, *Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of Nisin on cecal microflora structure and lipid metabolism of mice with diarrhea. Fifty 7 to 9 weeks old specific pathogen free （SPF） mice (half male and half female) were randomly divided into five groups: blank control group, negative control group, ciprofloxacin group, ampicillin group and Nisin group. The mice in negative control group, ciprofloxacin group, ampicillin group and Nisin group were intraperitoneally injected with pathogenic *Escherichia coli* suspension (2.50×10^{11} CFU/mL) at the dose of 0.2 mL per mouse for successive 3 days to establish the diarrheal model, and the mice in blank control group were intraperitoneally injected with equivalent sterrilled normal saline. After injection 3 days, the mice in blank control group and negative control group were given sterrilled normal saline by gavage, and the mice in other groups were given correspondent substances by gavage for 15 days, the dose of 0.3 mL each time, twice times a day. Samples were collected after 2 h administration on day15, the microflora structure of caecum content was analyzed by high throughput sequencing technology, and the contents of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin (ADAMTS1), total cholesterol (TC) and insulin (INS) in serum, jejunum, ileum and brain tissue were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The results showed as follows: compared with the negative control group, Nisin could significantly decrease the ADAMTS1 content in serum, ileum and brain tissue and the INS content in ileum (P<0.05), significantly increase the TC content in serum, jejunum and brain tissue (P<0.05), and significantly increase the body weight of mice in each stage (P<0.05). The caecal microflora richness (ACE index=2 469.54, Chao1 index=3 340.29) and diversity (Shannon index=7.56) of

mice in Nisin group were the highest, and those in negative control group were the lowest. Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes were dominant phylums in Nisin group, and Actinobacteria, Gemmatimonadetes and Proteobacteria were dominant phylums in negative control group. The results indicate that Nisin can enhance the diversity of caecal microflora, decrease the decrease the ADAMTS1 content in serum, ileum and brain tissue and the INS content in ileum, increase the TC content in serum, jejunum and brain tissue, and then affect the cecal microflora structure and lipid metabolism of mice with diarrhea.

Key words: Nisin; intestinal microbiota; brain-intestine; ADAMTS1; high-throughput sequencing